

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. Januar 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/09125 A1(51) Internationale Patentklassifikation⁷:
B03C 1/01, G01N 33/543, C12N 15/10

H01F 1/00,

(74) Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR;
Mozartstrasse 17, 80336 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/08392

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. Juli 2001 (20.07.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 35 953.1 21. Juli 2000 (21.07.2000) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT
ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54,
80636 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER-SCHULTE,
Detlef [DE/DE]; Lütticherstrasse 517 b, 52074 Aachen
(DE). FISCHER, Rainer [DE/DE]; Menzerath 1, 52156
Aachen-Monschau (DE).(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.(54) Title: SPHERICAL, MAGNETIC SiO₂ PARTICLES WITH AN ADJUSTABLE PARTICLE AND PORE SIZE AND AN
ADJUSTABLE MAGNETIC CONTENT, METHOD FOR PRODUCING THEM AND USE OF SiO₂ PARTICLES OF THIS TYPE(54) Bezeichnung: SPHÄRISCHE, MAGNETISCHE SiO₂-PARTIKEL MIT EINSTELLBARER TEILCHEN- UND POREN-
GRÖSSE SOWIE EINSTELLBAREM MAGNETGEHALT, VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG UND VERWENDUNG
DERARTIGER SiO₂-PARTIKEL(57) Abstract: The invention relates to a method for producing magnetic SiO₂ particles, comprising the following steps: a) alkoxysilanes are dispersed in water, acid-catalytically hydrolyzed and condensed to form an SiO₂ hydrosol; b) a magnetic particle-sol mixture is produced by adding magnetic particles, for example usual magnetic particles, magnetic colloids and/or ferrofluids to the SiO₂ hydrosol; c) dispersing the magnetic particle-sol mixture in an organic solvent which is immiscible with water; and d) adding a base to the magnetic particle-sol mixture during or after the dispersion in the organic solvent in order to form a gel.(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung magnetischer SiO₂-Partikel mit den folgenden Schritten: a) es werden Alkoxysilane in Wasser dispergiert, säurekatalytisch hydrolysiert und zu einem SiO₂-Hydrosol kondensiert, b) zur Herstellung einer Magnetpartikel-Sol-Mischung werden dem SiO₂-Hydrosol magnetische Partikel, wie beispielsweise herkömmliche magnetische Partikel, magnetische Kolloide und/oder Ferrofluide, zugemischt, c) die Magnetpartikel-Sol-Mischung wird in einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel dispergiert und d) der Magnetpartikel-Sol-Mischung wird während oder nach der Dispersion in dem organischen Lösungsmittel zur Gelbildung eine Base zugesetzt.

WO 02/09125 A1

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

20 Sphärische, magnetische SiO₂-Partikel mit einstellbarer Teilchen- und Porengröße sowie einstellbarem Magnetgehalt, Verfahren zu deren Herstellung und Verwendung derartiger SiO₂-Partikel

25 Die vorliegende Erfindung betrifft magnetische SiO₂-Partikel mit einstellbarer Poren- und Teilchengröße sowie einstellbarem Magnetgehalt, ein Verfahren zu ihrer Herstellung sowie deren Verwendung. Derartige SiO₂-Partikel werden insbesondere im Bereich der Aufreinigung und Analyse, insbesondere von Biomolekülen sowie als Träger für Biokatalysatoren beispielsweise im Bereich der Biotechnologie, als Adsorber beispielsweise im Bereich der Medizin oder als Stimuli-Respons-Gel verwendet.

35 SiO₂-Gele verschiedenster Provenienz sind seit langem als Chromatographie-Medien bekannt, ihr Einsatz speziell für die Nukleinsäure-Aufreinigung wurde jedoch erst Anfang der 80er Jahre erkannt und in

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

2

DE 32 11 309 A1 beschrieben. Bei den dort aufgeführten Partikeln handelt es sich um reine SiO_2 -Gele, die ausschließlich in der Säurechromatographie Verwendung finden.

5

Silanisierte Eisenoxid-Partikel für die Immobilisierung von Enzymen sind aus der US 4,152,210 A bekannt. Ebenfalls zum Zwecke der Enzymimmobilisierung sind in der US 4,343,901 ferromagnetische Partikel, die durch eine Sol-Gel-Technik hergestellt werden, beschrieben.

10

In der PCT EP97/04828 werden 50-150 nm große monodisperse Magnetpartikel beschrieben, die aus einem SiO_2 -Kern bestehen, der durch Beschichten mit Eisenoxid magnetische Eigenschaften erhält. Durch anschließende Silanisierung der Eisenoxid-Schicht sind die Teilchen befähigt, Nukleinsäuren zu binden.

15

Magnetische SiO_2 -Hybrid-Partikel, bestehend aus einem Polystyrol Kern, auf den Magnetit und anschließend eine SiO_2 -Schicht aufpolymerisiert wird, sind aus PCT/US 95/12988 bekannt. Die Partikel werden für die Antikörper- und Zellseparation eingesetzt.

20

Mit kolloidalem SiO_2 beschichtete Eisenoxid Partikel sind in der US 4,280,918 A offenbart.

25

Goetz et al. (Biotechn. & Bioengineering, Vol. 37, 614, 1991) beschreiben zur Enzymimmobilisierung befähigte, 20-100 μm große magnetische SiO_2 -Gel-Partikel, die durch elektrostatische Beschichtung von Nickel-Pulvern mit SiO_2 -Solen erzeugt werden. In ähnlicher Weise ist von Homola und Lorenz (IEEE Transaction on Magnetism, Vol. 22, 716, 1986) ein elektrostatisches Beschichten von SiO_2 -Partikeln auf Fe_2O_3 -Teilchen für die Herstellung magnetischer Speichermedien beschrieben.

30

35

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

3

ben.

5 Kolloidale Metallpartikel für den Einsatz im Immunoassay werden in der Anmeldung PCT/US97/03886 beschrieben.

10 Aus der US 5,320,944 A sind 0,2-3 µm große Magnetpartikel bekannt, die durch Beschichten eines Polymerpartikels mit Eisenoxiden magnetische Eigenschaften erhalten. Durch weitere Beschichtung der Partikel mit Silanen, Nylon oder Polystyrol können anschließend Antikörper für den Einsatz im Immunoassay an die Partikel gekoppelt werden. Die Herstellung eines optischen Sensors in Form von Glas- oder transparenten Polymerträger, auf denen Edelmetall-Kolloide zur Verbesserung der Effektormolekülanbindung für den Einsatz im Immunoassay aufgebracht sind, gehen aus der WO 99/13993 hervor.

20 Die Synthese von Kieselgelen für die Gelpermeationschromatographie, die mittels Cer(IV)-Initiierung mit Vinylmonomeren gepfropft werden, um die unspezifische Proteinadsorption zu unterdrücken, ist aus PCT/EP94/01378 bekannt.

25 Organosilanisierte kolloidale SiO₂-Gel-Partikel als biologische Separationsmedien sind in den US 4,927,749 A und US 4,927,750 A sowie der WO 99/36359 offenbart, wobei die Stabilität der Kolloide und Art und Weise der Silanisierung im Vordergrund stehen, Magnetpartikel, die ein magnetisches Kernmaterial enthalten und mit einem anorganischen Oxid beschichtet sind, werden in EP 0 343 934 A1 offenbart. Polymerpartikel, die mit einer weiteren, ein magnetisches Material enthaltenden Polymerschicht beschichtet sind, auf der ein dritter zur Interaktion

30

35

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

4

lekülen befähigter Polymerüberzug aufgetragen ist,
sind in der PCT/FR97/00912 beschrieben.

5 10-60 µm große Perlglanzfarbpigmente, die mit Magnetit ummantelt und zur Trennung von biologischen Gemischen vorgesehen sind, gehen aus der PCT/DE97/01300 hervor.

10 Magnetische Hybridpartikel, die aus einem Polymerkern bestehen, die zunächst mit einem Ferrofluid beschichtet und anschließend mit einem funktionellen Polyacrylat beschichtet werden, sind Gegenstand der US-Patentschrift 5,648,124.

15 Die aus dem Stand der Technik bekannten Partikel weisen in bezug auf die Abtrennung von Nukleinsäuren einige Nachteile auf: zum einen sind eine Reihe von Trägermedien nicht magnetisch (US 4,927,750 A, DE 32 11 309 A1, WO 99/36359; WO 94/26379), so daß
20 eine rasche Abtrennung der Partikel, wie heute bei Routineanalysen gefordert, nicht möglich ist, d.h., man ist auf säulenchromatographische Verfahren angewiesen, zum anderen weisen Magnetpartikel auf SiO₂- oder Polystyrol-Basis, die mit einem magnetischen
25 Oxid beschichtet sind, eine hohe spezifische Dichte auf (WO 98/12717, US 4,152,210 A, EP 321 1309 A1, US 5,320,944 A). Daraus resultiert eine unzureichende Dispergierbarkeit, die zum schnellen Absetzen der Teilchen führt. Der Einsatz dieser Teilchen in einem
30 Immuno- oder Nukleinsäureassays, der vorwiegend in Suspension durchgeführt wird, ist dadurch nachhaltig beeinträchtigt, man ist daher auf eine zusätzliche mechanische Durchmischung angewiesen. Der entscheidende Nachteil der beschichteten Partikel besteht jedoch darin, daß die Metalloxide sowohl als Kernmaterial als auch als Beschichtungsmaterial trotz der an-
35

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

5

5 schließenden Silanisierung direkt mit der Analysenlösung in Kontakt kommen können. Dies stellt ein gravierendes Problem bei der Nukleinsäure-Analytik z.B. im Rahmen der Polymerase-Ketten-Reaktion ("PCR") dar, da die bei der PCR benutzten Polymerasen im Kontakt mit Eisenverbindungen deaktiviert werden können. Bei den aus dem Stand der Technik bekannten Magnetpartikeln sind darüber hinaus keine besonderen verfahrenstechnischen Maßnahmen angegeben, die zu einer gezielten Porengrößeneinstellung führen, ein Parameter, der entscheidenden Einfluß auf die Effizienz der Nukleinsäure-Aufreinigung hat.

10 Die aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren zur Herstellung der Magnetpartikel sind grundsätzlich sehr aufwendig und bedürfen eines mehrstündigen Herstellungsprozesses.

20 Von diesem Stand der Technik ausgehend ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung magnetische SiO₂-Partikel, Verfahren zu deren Herstellung und Verwendung derartiger Partikel zur Verfügung zu stellen, bei denen keine arbeits- und zeitaufwendigen Beschichtungstechniken erforderlich sind und die Teilchengröße, Porengröße sowie der Magnetanteil in gezielter Weise eingestellt werden kann.

30 Diese Aufgabe wird durch das Verfahren zur Herstellung magnetischer SiO₂-Partikel gemäß Patentanspruch 1, Partikel gemäß Patentanspruch 68 oder 69 sowie durch die Verwendung gemäß Patentanspruch 74 gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Verfahrens sowie der erfindungsgemäßen Partikel werden in den jeweiligen abhängigen Ansprüchen gegeben.

35 Ausgangspunkt der Erfindung sind Präpolymere in Form

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

6

von SiO₂-Hydrosolen, die mit magnetischen Kolloiden oder Magnetpartikeln vermischt werden und anschließend in heterogener Phase zu sphärischen Polymerpartikeln polykondensiert werden.

5

Unter Magnetpartikel im Sinne der vorliegenden Erfindung werden hier herkömmliche Magnetpartikel, magnetische Kolloide und/oder Ferrofluide verstanden, wobei „Kolloide“ bzw. „Ferrofluide“ definitionsgemäß alle magnetischen Nanopartikel, die entweder unter oder ohne Zugabe eines Stabilisators, Tensids oder Emulgators eine stabile wässrig-kolloidale Dispersion bilden, umfassen.

15

Die Herstellung der SiO₂-Sole geschieht nach den bekannten Sol-Gel-Verfahren durch Hydrolyse von Alkoxysilanen mit Hilfe verdünnter Mineralsäuren oder Säuren auf organischer Basis. Als Mineralsäuren kommen Salzsäure oder Carbonsäuren wie Essigsäure, Ameisensäure oder Propionsäure zum Einsatz. Zur Gewinnung der SiO₂-Sole werden die Alkoxysilane in Wasser dispergiert und durch Säurezugabe hydrolysiert. Als Alkoxysilane können Kieselsäureorthoester aliphatischer Alkohole eingesetzt werden, wobei bevorzugt Methyl-, Äthyl- oder Propylester einzeln oder als Mischungen zum Einsatz kommen. In der Folge findet eine Kondensation zu niederpolymeren SiO₂-Hydrosolen statt, die nach und nach durch weitere Polykondensation zu mehr oder weniger viskosen Solen bzw. Gelen führen. Dieser Sol-Gel-Prozeß wird in der Regel bei tieferen Temperaturen, vorzugsweise unter Eiskühlung, durchgeführt. Um die heterogene Silan-Wasser-Phase besser zu durchmischen, wird die Reaktion in einem Ultraschallbad oder unter Zuhilfenahme einer Ultraschallsonotrode durchgeführt. Je nach Zusammensetzung reichen Beschallungszeiten von 5 bis 30 Minuten aus, wobei die

20

25

30

35

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

7

5 Beschallungszeiten allgemein mit zunehmender Säurekonzentration abnehmen. Die vorzugsweise eingesetzten Mineralsäuren weisen durchweg eine Konzentration von 0,02 bis 1 Mol/Liter auf, wobei der Volumenanteil der Säuren im Ansatz 15-35%, vorzugsweise 20-28%, beträgt. Die Monocarbonsäuren werden als reine Säuren eingesetzt, ihr Volumenanteil beträgt 15-30%.

10 Die Stöchiometrie des Gels wird entscheidend von der Art und Weise der Hydrolyse und Polykondensation bestimmt. So führt die Säurekatalyse im allgemeinen zu höheren Hydrolyseraten unter verlangsamter Polykondensation, während umgekehrt die Zugabe von Basen die Polykondensation fördert. Wie aus dem Stand der Technik
15 allgemein bekannt ist, wird die Spezifität der Nukleinsäure-Aufreinigung entscheidend durch die Porenstruktur bestimmt, derart, daß Nukleinsäuremoleküle mit einer Molmasse >50 kDa vorzugsweise auf Separationsträgern mit einer Porengröße von 30 nm aufgetrennt werden, während für Nukleinsäuren <50 kDa-Träger mit einer Porenweite von 5-30 nm besonders geeignet sind.
20

25 Beide zum Sol führenden Reaktionsmechanismen Hydrolyse und Polykondensation können dazu benutzt werden, die Porenstruktur der Gele gezielt zu verändern bzw. einzustellen. Dies läßt sich konkret dadurch erreichen, daß die Sol-Phase in Gegenwart einer definierten Säurekonzentration hergestellt wird. Unter sonst
30 gleichen Testbedingungen führen Säurekonzentrationen von >0,15 Mol/Liter in der Regel zu Porenweiten von >30 nm, wohingegen eine Verringerung der Säurekonzentration auf <0,15 Mol/Liter mit einer Reduktion der Porengröße unterhalb 30 nm einhergeht. Die erwähnten
35 Parametereinstellungen sind grundsätzlich mit den jeweiligen Bedingungen der nachfolgenden basenkataly-

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

8

sierten Polykondensation verknüpft. So lassen sich in der Regel die oben aufgeführten Porendimensionen durchweg unter Zugabe einer 1-3 %igen Ammoniak-Lösungen realisieren. Die Verwendung höherkonzentrierter Basen (6-25 %) führt demgegenüber unter sonst gleichen Säurekonzentrationsverhältnissen zu Porendurchmessern von <30 nm. Neben der Hydrolyse und Polykondensation als strukturbestimmende Faktoren, konnte überraschenderweise auch gezeigt werden, daß unter Nutzung beider Reaktionsmechanismen die Viskosität der Sol-Phase zur Einstellung der Teilchengrößen herangezogen werden kann.

Die Viskosität der Sole leitet sich unmittelbar aus der spezifischen Reaktionsweise der Sol-Gel-Bildung während des Alterungsprozesses ab. Im Verlaufe dieses Prozesses tritt unter Ausbildung von Oxo-Brücken Wasser und Alkohol aus dem Sol aus, der von einer parallelen Viskositätserhöhung begleitet ist. Dieser Anstieg der Viskosität führt unter sonst gleichen Verfahrensbedingungen (Rührgeschwindigkeit, chemische Zusammensetzung) zu einer Partikelvergrößerung. So werden allgemein Teilchen mit einer Größe von <100 µm vorwiegend bei einer Viskosität des Sols von <40 cp (bzw. cP) und Teilchen >200 µm aus Solen mit einer Viskosität von >40 cp (bzw. cP) gebildet.

Durch die Zusammensetzung des erfindungsgemäßen Silan-Ansatzes werden nicht nur die morphologischen Anforderungen an die Separationsmedien erfüllt, es werden auch überraschenderweise die Voraussetzungen für die Herstellung sphärischer magnetischer SiO₂-Partikel geschaffen. Diese sind:

- a) Mischbarkeit der Sole mit wäßrigen Magnetkolloiden oder Magnetpartikel-Suspensionen

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

9

- b) Ausbildung definierter Polymertröpfchen beim Dispergieren in geeigneten organischen Lösungsmitteln.

5

Sobald im ersten Herstellungsschritt die Silan-Suspension durch Hydrolyse homogenisiert ist, kann das Sol für die weitere Partikel-Herstellung verwendet werden. Ein sofortiger Einsatz der Sole ist jedoch nicht unbedingt notwendig, da die Sole, je nach Säurekonzentration und Sol-Ansatz, über mehrere Tage hinweg eine fluide Konsistenz beibehalten und sich noch nach Tagen verarbeiten lassen.

15

Im zweiten Verfahrensschritt erfolgt die Zumischung eines magnetischen Kolloids oder Ferrofluids zu dem Sol. "Kolloide" bzw. "Ferrofluide" umfassen definitionsgemäß alle magnetischen Nanopartikel, die entweder unter oder ohne Zugabe eines Stabilisators, Tensids oder Emulgators eine stabile wäßrig-kolloidale Dispersion bilden. Als magnetische Nanopartikel kommen Magnetit sowie Übergangsmetalloxide, Ferrite oder sonstige nanopartikulären Verbindungen in Frage, die entweder ferro-, ferri -oder superparamagnetischer Natur sind. Die Herstellung solcher Kolloide bzw. Ferrofluide sind mannigfaltig beschrieben in:

20

25

US 4,628,037; BR 1 439 031, EP 0275 285 A1, US 3,917,538 A; US 4,827,945 A; US 4,329,241 A.

30

35

Hauptkriterium für die Auswahl geeigneter Kolloide bzw. Ferrofluide stellt ihre Kompatibilität mit dem SiO₂-Sol dar, d.h., das Kolloid darf im Kontakt mit der Sol-Phase nicht ausflocken oder agglomerieren. Ferrofluide, die eine homogene Dispersion mit den Solen eingehen, sind solche, die entweder geladene Tenside z.B. in Form aromatischer oder aliphatische Sul-

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

10

fonsäurederivate oder aliphatische Carbonsäuren enthalten. Solche Fluide sind auch kommerziell erhältlich.

5 Alternativ lassen sich auch magnetische Kolloide ohne Zusatz von Tensiden, Emulgatoren oder sonstigen oberflächenaktiven Substanzen herstellen. Dazu werden die bekannten Fällungsverfahren aus Eisen(II)-und Eisen (III)-Salzlösungen, wie u.a. von Khalafalla und Reimers (Br. Patent 143 9 03 1), Shinkai et al. (Biocatalysis, Vol 5, 61, 1991) oder Kondo et al. (Appl. Microbiol. Biotechn., Vol. 41, 99, 1994) beschrieben, verwendet. Entscheidend bei der Synthese dieser Kolloide ist die sorgfältige Entfernung der Fremdionen
10 entweder mittels der Magnetopherese oder durch Dialyse. Bei der Magnetopherese wird das Rohprodukt durch eine mit Stahlwolle dichtgepackte chromatographische Säule (bevorzugter Durchmesser 0,4-10 mm), die sich zwischen den Polen eines starken Permanent- oder
15 Elektromagneten befindet, hindurch geleitet. Aufgrund des dadurch erzeugten Hochgradientenmagnetfeldes läuft die überschüssige Salzlösung durch die Säule ungehindert durch, während das Kolloid bzw. Ferrofluid retendiert wird. Durch mehrmaliges Waschen
20 des retendierten Kolloids können restliche Salze weitgehend entfernt werden. Nach Herausnahme der Säule aus dem Magnetfeld bzw. Abschalten des Magnetfeldes kann das Kolloid dann durch einfache Elution wiedergewonnen werden.

30 Außer der Verwendung der obigen Kolloide bzw. Ferrofluide sind grundsätzlich auch solche Magnetpartikel zur Einkapselung verwendbar, die über eine feste Polymerhülle z.B. in Form von Polyvinylacetat, Polyvinylalkohol, Dextran, Polyacrolein, Polystyrol,
35 Albumin oder Alginat verfügen. Solche Magnetpartikel,

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

11

- 5 die im allgemeinen eine Teilchengröße von 0,05 bis
3 µm aufweisen und im Bereich der Biomolekül-Aufrei-
nigung eingesetzt werden, sind aus dem Stand der
Technik bekannt: PCT/EP96/02398, J. Appl. Polymer
Sci., Vol 50, 765, (1993), / Anal. Biochem., Vol 128,
342, 1983,
US 4,654,267 A; J. Cell Sci., Vol 56, 157, 1982;
Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 78, 579, 1981,
10 DE 35 08 000 A1; Magnetpartikel dieser Art werden
auch kommerziell u.a. unter der Bezeichnung Dyna-
beads, BioMag, Estapor, M-PVA, AGOWA, BioBeads oder
SPHERO angeboten, wobei es sich bei diesen Bezeich-
nungen z.T. um eingetragene Warenzeichen handelt.
- 15 Diese Magnetpartikel werden in analoger Weise wie die
Kolloide bzw. Ferrofluide zur Herstellung der erfin-
dungsgemäßen SiO₂-Partikel eingesetzt.
- 20 Die Magnet-Kolloid-Sol-Mischung wird im nachfolgenden
Schritt in einem organischen Lösungsmittel unter Rüh-
ren dispergiert. Als Dispergiermittel sind solche Lö-
sungsmittel geeignet, die mit Wasser nicht-mischbar
sind und entweder Emulsionen oder Dispersionen bil-
den. Es hat sich überraschenderweise herausgestellt,
25 daß vor allem solche organischen Lösungsmittel zu ei-
ner stabilen Dispersion führen, die einen Vertei-
lungskoeffizienten von >2 aufweisen. Gemäß Laane et
al. (in "Biocatalysis in Organic Media", Laane et al.
Hrsg., Elsevier, Amsterdam, pp 65, 1987) wird damit
30 der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten in einem
Standard Octanol-Wasser-Zweiphasensystem definiert.
Lösemittel, die diese Eigenschaften erfüllen, sind
z.B. Chloroform, Trichlorethylen, 1.1.1-Trichlor-
äthan, Hexan, Petroläther, Toluol, Tetrachlorkohlen-
stoff, Heptan, Octan. Auch Mischungen der obigen Lö-
35 sungsmittel, die eine Dichte von ca. 1 g/cm³ aufwei-

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

12

sen, eignen sich gut zum Dispergieren.

Die Herstellung der Magnetpartikel ist grundsätzlich mit den oben angegebenen reinen Lösungsmitteln möglich. In bezug auf eine engere Größenverteilung der Partikel und auf ein besseres Dispergierverhalten konnte überraschenderweise gezeigt werden, daß der organischen Phase ein oder zwei Emulgatoren bzw. Tenside zugesetzt werden können. Zusätze dieser Art sind z.B.: Polyglycerinester, Polyäthylenglykol-Castoröl-Derivate, Polyoxyäthylen-Sorbitan-Fettsäureester, Alkylphenylpolyäthylenglykol-Derivate, Blockcopolymere aus Rizinusöl-Derivaten, Propylenoxid-Äthylenoxid-Blockcopolymere, modifizierte Polyester, Polyäthylenglykol-Ätherderivate, Polyoxypropylen-Äthylen-diamin-Blockcopolymere Sorbitan-Fettsäureester, Polyäthylenglykole, Polyoxyäthylen-, Polyoxyäthylen-Alkohol-Derivate, Polyhydroxyfettsäure-Polyäthylenglykol-Blockcopolymere. Substanzen dieser Art sind im Handel u.a. unter der Handelsbezeichnung: Hypermer®, Renex®, Estol®, Pluronic®, Eumulgin®, Tetronic®, Triton®, Brij®, Lameform®, Pripol®, Arlacel®, Pri-sorine®, Span®, Tween®, Dehymuls® oder Synperonie®.

Die für die Herstellung der Magnetpartikel bevorzugt relevanten Emulgatorkonzentrationen liegen zwischen 0,1 und 15%, vorzugsweise zwischen 0,5 und 6 Vol- bzw. Gew.-%.

Zum Dispergieren lassen sich zwar grundsätzlich auch herkömmliche Pflanzenöle sowie Mischungen von Pflanzenölen mit den organischen Lösungsmitteln verwenden, es hat sich jedoch gezeigt, daß die Verwendung organischer Lösungsmittel gegenüber den Ölen einige Vorteile aufweisen. Diese liegen in der niedrigen Viskosität der organischen Verbindungen gegenüber dem Öl

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

13

begründet. Die niedrige Viskosität ermöglicht die Abtrennung der synthetisierten Magnetpartikel aus dem Reaktionsgemisch innerhalb weniger Sekunden mit Hilfe eines handelsüblichen Handmagneten. Dieser Abtrennschritt erfordert bei der Verwendung von Pflanzenölen dagegen bis zu einigen Stunden, gefolgt von umfangreichen Waschprozessen mit organischen Lösungsmitteln, die notwendig sind, um das Restöl von den Magnetpartikel zu entfernen. Beim vorliegenden Verfahren dagegen können die verwendeten Lösemittel in einfacher Weise durch Redestillation wiedergewonnen werden. Die Volumenverhältnisse organische Phase zu Hydrosol betragen in der Regel 8:1 bis 30:1 sowie 2:1 bis 4:1 in bezug auf das Volumenverhältnis Sol zu Magnet-Kolloid. Der Gewichtsanteil des magnetischen Festkörpers im Sol-Ansatz liegt zwischen 10-55 %. Die Möglichkeit der einfachen und gezielten Einstellung des Magnetanteils durch bloßes Zumischen des Magnet-Kolloids, die dieses Verfahren gegenüber dem Stand der Technik auszeichnet, eröffnet ein breites Anwendungsspektrum, das über die bloße Auftrennung von Biomolekülen und Nukleinsäuren oder die Biomolekülanalyse, wie in WO98/12712; DE 32 11 309 A1; US 5,320,944 A; US 4,927,749 A; US 4,927,750 A; WO 99/36359, PCT/FR97/00912 beschrieben, weit hinausgeht. Dies betrifft z.B. den Einsatz der Magnetpartikel als Biokatalysatoren in biotechnologischen Fermentationsprozessen, als Protein-Einkapselungsmatrix, als "Stimuli-Response"-Gels oder als Adsorber in der Hämoperfusion. Diese zusätzlichen Anwendungen ergeben sich dadurch, daß mit Hilfe der erfindungsgemäßen Verfahren und Produkte Biomoleküle wie Enzyme oder Proteine sowohl in die Sol-Gel-Matrix durch einfaches Zumischen zu dem Sol-Ansatz eingekapselt als auch über aktive Gruppen, wie unten noch erläutert wird, an den SiO₂-Träger kovalent gekoppelt werden können.

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

14

Zur Fixierung der magnetischen SiO_2 -Dispersion zu definierten Magnetpartikeln wird im letzten Verfahrensschritt während des Durchmischungsvorgangs eine Base zugesetzt. Diese Basenzugabe führt innerhalb von Sekunden zu einer festen Gelbildung des Polymertröpfchens. Der Gelbildungsprozeß ist dabei um so kürzer, je höher die gewählte Basenkonzentration ist. Vorzugsweise wird als Base Ammoniak verwendet, andere Basen, wie z.B. NaOH, können grundsätzlich auch eingesetzt werden. Die Natronlauge wird in der Regel als 0,05 bis 0,1 molare Lösung, Ammoniak durchweg in Form einer 1 bis 12 %igen wäßrigen Lösung verwendet. Die Volumenverhältnisse Base zu Sol liegen üblicherweise bei 1:2 bis 1:4.

Da die Gelierungsreaktion sehr rasch abläuft, erfordert der Herstellungsprozeß für die Basispartikel einschließlich der Synthese des Sols und des Ferrofluids bzw. Kolloids einen Zeitaufwand von weniger als einer Stunde. Das bedeutet gegenüber allen herkömmlichen Verfahren eine Zeitersparnis von 60 bis 90 %.

Zum Durchmischen des Sol-Lösemittel-Ansatzes gibt es keinerlei besondere Beschränkungen, es können grundsätzlich die gängigen Rührgeräte verwendet werden. Für die Herstellung besonders feiner Partikel-Fraktionen ($<10 \mu\text{m}$) sind handelsübliche Dispergierwerkzeuge, die nach dem Rotor-Stator-Prinzip arbeiten (z.B. Ultra-Turrax®), mit einer Umdrehungsleistung bis zu 20.000 U/min erforderlich. Zwischen Rührgeschwindigkeit und Teilchengröße besteht eine umgekehrte Proportionalität dergestalt, daß Teilchengrößen zwischen 20 und 500 nm allgemein durch Rührgeschwindigkeiten im Bereich von 800-1800 U/min erzeugt

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

15

5 werden und Teilchen im Bereich von 0,5 -10 µm Rührge-
schwindigkeiten von 5000-20.000 U/min erfordern. Der
Rührvorgang dauert in der Regel 2 bis 5 Sekunden. Die
erzeugten Magnetpartikel können sodann mit Hilfe ei-
nes Handmagneten aus der Suspension abgetrennt wer-
den. Diesem Prozeß schließen sich mehrere Waschungen
mit Alkohol und Wasser an. Die erhaltenen Magnetträ-
ger werden üblicherweise in Wasser aufbewahrt. Danach
10 können die gewonnenen SiO₂-Partikel direkt zur Auf-
reinigung von Nukleinsäuren oder Proteinen gemäß den
bekannten Methoden genutzt werden.

15 Für die Separation von Nukleinsäuren haben sich in
der Praxis nicht nur Trägermedien auf reiner SiO₂-
Basis als nützlich erwiesen, es ist auch bekannt, daß
insbesondere Medien mit kationischen Gruppen (Anio-
nenaustauscher) für die Nukleinsäure Auftrennung her-
vorragend geeignet sind. Träger solcher Art sind aus
DE 32 11 309 und DE 37 17 209 bekannt. Dieser Träger-
20 typ läßt sich durch chemische Umsetzung der SiO₂-
Partikel mit Epoxy-substituierten Alkoxysilan wie
z.B. 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan oder 3-
Glycidyloxypropylmethyldiäthoxysilan und anschließen-
de nukleophile Öffnung des Oxiranringes mittels ter-
25 tiärer oder sekundärer Alkylamine herstellen. Auch
die Synthese stark und schwach saurer Ionenaustau-
scher sowie von Metallchelate-Trägern ist durch Umset-
zung der beschriebenen Epoxy-substituierten SiO₂-
Partikel mit Hilfe von Carbonsäuren, Sulfiten, Thio-
30 sulfaten bzw. Amino-substituierten Carbonsäuren, z.B.
Nitrilotriessigsäure oder Iminodiessigsäure, möglich.

35 Die chemische Modifizierung der SiO₂-Partikel bleibt
nicht auf die Herstellung von Ionenaustauschern be-
schränkt. In einer besonderen Ausführungsform können
die SiO₂-Träger mit substituierten Alkylalkoxysilanen

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

16

der allgemeinen Formel $X-(CH_2)_n-Si-(OR)_3$, wobei X ein Halogen, Cyano-, NH_2 -oder Mercapto-Rest, $n = 1-6$, vorzugsweise 3, R ein Alkyl-, Trialkylsilyl-Rest oder H bedeuten, umgesetzt werden. An die so modifizierten Träger lassen sich für die Separation gemäß dem Affinitätsprinzip oder für den Einsatz als Biokatalysatoren Liganden in Form von Peptiden, Proteinen oder Enzymen kovalent koppeln. Hierfür bieten sich mehrere Möglichkeiten an:

1. Protein- und andere Liganden können durch einfache Inkubation mit den Halogen-substituierten Trägern direkt gekoppelt werden.
2. Protein-Liganden lassen sich unter Verwendung von Dialdehyden mit den Aminogruppen-substituierten Magnetpartikel kovalent binden.
3. Amino-substituierte SiO_2 -Träger werden zunächst unter Verwendung von Succinanhydrid umgesetzt und die gebildeten Carboxylgruppen anschließend z.B. mit Carbodiimiden aktiviert. An die aktivierten Gruppen können Protein-Liganden direkt gekoppelt werden.
4. Bindung von Protein-und anderer Liganden über die Oxiran-Gruppe der oben beschriebenen Epoxy-substituierten SiO_2 -Partikel.

In analoger Weise wie die Proteine lassen sich auch Amino-funktionalisierte Nukleinsäuren jedweder Art mit Hilfe der beschriebenen Methoden an den SiO_2 -Träger koppeln.

Ohne auf weitere detaillierte Ausführungen diese Kopplungen und Modifikationen betreffend einzugehen,

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

17

5 die u.a. in "Scientific and Clinical Applications of
Magnetic Carriers", Häfeli et al. (Hrsg.), Plenum
Press, New York, 1997, und Shriver-Lake in "Immobi-
lized Biomolecules in Analysis", T. Cass und F.S.
Ligler Hrsg., Oxford University Press, 1998, be-
schrieben sind, wird davon ausgegangen, daß ein Fach-
mann auf diesem Gebiet die speziellen Reaktionsmetho-
den hinreichend kennt und daher die Beschreibung
10 grundsätzlich nutzen kann. Die beschriebenen Ausführ-
ungsformen sind daher in keiner Weise als limitie-
rende Offenbarungen aufzufassen.

15 Neben der Möglichkeit, Magnetpartikel aus reinem
SiO₂-Gel herzustellen, konnte überraschenderweise ge-
zeigt werden, daß sich die Magnetpartikel auch durch
Mischen von SiO₂-Solen mit synthetischen, halbsynthe-
tischen oder natürlichen organischen Polymeren her-
stellen lassen. In bezug auf die veränderte Morpholo-
gie und das chemische Reaktionsverhalten gegenüber
20 den reinen SiO₂-Gelen ergibt sich ein modifiziertes
Eigenschaftsspektrum, das eine Erweiterung des Appli-
kationsrahmens eröffnet. Dies bezieht sich im beson-
deren auf die Anwendung im Bereich der Aufreinigung
hochmolekularer Nukleinsäuren sowie die Abtrennung
25 von Proteinen. Durch die Polymermischung gelangt man
zu Hybridpolymeren, die partiell sowohl die chemisch-
physikalischen Eigenschaften der organischen Polymere
als auch die der SiO₂-Gele in sich vereinen. Konkret
sind diesbezüglich das Adsorptionsverhalten der Hy-
bridpartikel gegenüber Proteinen, die mechanische Fe-
stigkeit sowie die Basenstabilität zu nennen.

35 Als Mischpolymere kommen weitgehend solche Polymere
in Frage, die wasserlöslich und mit den SiO₂-Solen
kompatibel sind, d.h. homogene Mischungen ohne Pha-
sentrennung bilden können. Die erfindungsgemäßen Pro-

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

18

5 dukte und deren gezielte Anwendung in ausgewählten
biochemischen und biotechnologischen Bereichen be-
treffend, sind solche Polymere bevorzugt, die sowohl
eine gezielte Modifikation der morphologischen Struk-
tur im Hinblick auf eine Oberflächenvergrößerung als
auch im Hinblick auf die Porenstruktur ermöglichen.

10 Polymere, die als Zusätze bevorzugt in Frage kommen,
sind z.B. Polyvinylalkohol, Polyacrylsäure, Polyami-
nosäuren, Polysaccharide, Proteine oder Polyvinylpyr-
rolidon. Erfindungsgemäß gelangen üblicherweise 0,5-
5 % wässrige Polymerlösungen zum Einsatz, die vor
dem Dispergierprozeß mit den SiO₂-Solen vermischt
werden. Der Volumenanteil der organischen Polymerlö-
15 sungen in der Solphase liegt zwischen 5 und 25%. Üb-
licherweise werden Polymere mit einer Molmasse von
15.000 bis 250.000 eingesetzt.

20 Die Verwendung der vorwiegend sehr hydrophilen Poly-
meren bietet auch im Hinblick auf die Abtrennung von
Proteinen die Möglichkeit, das bei reinen Kieselgelen
stark ausgeprägte unspezifische Adsorptionsverhalten
weitgehend zu unterdrücken.

25 Der Zusatz der organischen Polymeren zum Sol-Ansatz
ändert an der oben beschriebenen Verfahrensweise zur
Herstellung reiner SiO₂-Partikel grundsätzlich
nichts.

30 Nachfolgend werden einige Beispiele erfindungsgemäßer
Verfahren und SiO₂-Partikel beschrieben.

Beispiel 1

35

Eine Mischung aus 55 ml Tetraäthoxylsilan und 15 ml

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

19

0,05 M HCl werden in einem Ultraschallbad für 25 min. unter Eiskühlung beschallt. 20 ml des SiO₂-Sols, das bei 20 °C eine Viskosität von 36 cp aufweist, werden mit 5 ml eines Magnet-Kolloids, das gemäß der Vorschrift von Shinkai et al. (Biocatalysis, Vol 5, 61, 1991) durch Oxidation einer 0,6 molaren Eisen(II)salz-Lösung unter Verwendung von 0,3 M Na-Nitrit hergestellt wurde, vermischt. Die erhaltene Suspension wird in 280 ml 1.1.1-Trichlorethan, in denen 0,5 Vol% Tween 80 und 0,8 Vol % Prisorine gelöst sind, eingetragen. Der Ansatz wird unter Rühren (1800 U/min) einige Sekunden dispergiert, es werden anschließend 10 ml 1 %ige Ammoniak-Lösung zugefügt, die Dispersion wird noch 3 Sek. weitergerührt. Nach 5 Minuten werden die Magnetpartikel mittels Handmagnet aus der Suspension abgetrennt und je dreimal mit ca. 50 ml Ethanol und Wasser nachgewaschen. Es werden Magnetpartikel mit einer Teilchengröße von 20-60 µm gewonnen. Nach 12-stündiger Inkubation in Wasser werden die Partikel nochmals mehrfach mit Wasser gewaschen und anschließend mehrere Stunden im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Partikel weisen eine mittlere Porengröße von 24 nm auf. Die gewonnenen Magnetpartikel können nach den bekannten Methoden zur Aufreinigung von Nukleinsäuren verwendet werden.

Beispiel 2

Eine Mischung bestehend aus 25 ml des gemäß Beispiel 1 hergestellten Sols und 8 ml eines Magnetit-Kolloids, das entsprechend der Vorschrift von Khalafalla und Reimers (Br-Pat. 1 439 03 1) aus einer Eisen(III)-/Eisen(II)salz-Lösung (Molverhältnis 2:1) durch Ammoniak-Fällung gewonnen wurde, werden in 300 ml Toluol, in denen je 2 Vol % Pripol 1009 und

5 Tween 20 gelöst sind, mit Hilfe eines Ultra-Turrax bei 12.000 U/min. dispergiert. Nach Zugabe von 12 ml 3%iger Ammoniak-Lösung wird noch 2 Sekunden weiter dispergiert. Es folgt die Separation und Aufarbeitung analog Beispiel 1. Es werden Magnetpartikel mit einer Teilchengröße von 1-4 μm und einem Magnetit-Gehalt von 38 Gew.-% erhalten.

10

Beispiel 3

15 Eine Suspension bestehend aus 50 ml Tetramethoxysilan und 20 ml 0,3 M HCl werden für 5 min. in einem Ultraschallbad beschallt. 20 ml des so gewonnenen Sols, das eine Viskosität von 48 cP aufweist, werden mit 8 ml des gemäß Beispiel 2 hergestellten Magnetit-Kolloids und 2 ml einer 2,5%igen Polyvinylalkohol-Lösung (Molmasse = 224.000) vermischt. Die Suspension 20 wird anschließend unter Rühren (1600 U/min) in 320 ml Hexan, die 0,5 Vol.-% Estol SMO 3685 gelöst enthalten, dispergiert. Während des Dispergiervorganges werden 10 ml 1 %ige Ammoniaklösung zugefügt, und es wird 4 Sekunden weitergerührt. Separation und Aufarbeitung 25 der gewonnenen Magnetpartikel erfolgt analog Beispiel 1. Es entstehen Träger mit einer Größe von 80-150 μm und einer durchschnittlichen Porengröße von 58 nm. Die abgetrennte Magnetpartikel-Fraktion wird 5-mal mit getrocknetem Toluol nach jeweiliger magnetischer 30 Abtrennung gewaschen und anschließend 12 Std. nach Zugabe von 50 ml Toluol und 0,85 g 3-Aminopropyltriäthoxysilan am Rückfluß gekocht. Die Magnetpartikel werden wieder magnetisch abgetrennt und je 3-mal mit Toluol und Chloroform nachgewaschen. Es folgt mehr- 35 stündige Trocknung im Vakuum. Das amino-modifizierte Produkt wird anschließend mit 6 %iger Glutaraldehyd-

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

21

Lösung in 25 ml 0,1 M Na-Carbonat-Puffer, pH 9.2, für 3 Std. bei 35 °C umgesetzt. Es wird anschließend intensiv mit 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7.2, nachgewaschen. Die gewonnenen Aldehyd-funktionalisierten Magnetpartikel werden in 15 ml 0,1 M Phosphat-Puffer suspendiert. 2 ml der Suspension werden magnetisch abgetrennt und in 2 ml 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7.2, in dem 1,2 mg Streptavidin gelöst sind, inkubiert. Nach 6stündiger Reaktion bei 35 °C wird das Produkt fünfmal mit Phosphat-Puffer nachgewaschen. Um verbliebene Rest-Aldehydgruppen abzusättigen, wird das magnetisch abgetrennte Produkt in 5 ml 0,2 M Äthanolamin bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 5 Stunden inkubiert. Die anschließend mehrfach mit Phosphat-Puffer gewaschenen Magnetpartikel können direkt nach den bekannten Verfahren zur Bindung biotinylierter Nukleinsäuren oder biotinylierter Proteine verwendet werden.

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

22

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung magnetischer SiO₂-
5 Partikel indem
 - a) Alkoxysilane in Wasser dispergiert,
säurekatalytisch hydrolysiert und
zu einem SiO₂-Hydrosol kondensiert werden,
 - b) zur Herstellung einer Magnetpartikel-Sol-
10 Mischung dem SiO₂-Hydrosol magnetische Partikel,
wie beispielsweise herkömmliche magnetische Partikel, magnetische Kolloide und/oder Ferrofluide, zugemischt werden,
 - c) die Magnetpartikel-Sol-Mischung in einem mit
15 Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel dispergiert wird und
 - d) der Magnetpartikel-Sol-Mischung während oder nach der Dispersion in dem organischen Lösungsmitteln zur Gelbildung, eine Base zugesetzt
20 wird.
2. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß als Lösungsmittel Pflanzenöle oder organische Lösungsmittel mit

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

23

einem Verteilungskoeffizienten größer 2 oder Mischungen dieser verwendet werden.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Lösungsmittel Chloroform, Trichlorethylen, 1.1.1.-
5 Trichloräthan, Hexan, Petroläther, Toluol, Tetrachlorkohlenstoff, Heptan, Octan oder Mischungen von diesen verwendet werden.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Viskosität
10 des SiO_2 -Hydrosols derart eingestellt wird, so daß die erzeugten SiO_2 -Partikel einen vorbestimmten Durchmesser aufweisen.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Viskosität
15 des SiO_2 -Hydrosols zwischen 5 cp und 500 cp eingestellt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß zur Herstellung von SiO_2 -
20 Partikeln mit einem Durchmesser von kleiner 100 μm die Viskosität des Sols auf kleiner 40 cp eingestellt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch ge-

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

24

kennzeichnet, daß zur Herstellung von SiO_2 -Partikeln mit einem Durchmesser von größer 200 μm die Viskosität des Sols auf größer 40 cp eingestellt wird.

5 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Dispersion aus Hydrosol, magnetischen Partikeln, organischem Lösungsmittel und Base mechanisch gerührt wird.

10 9. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Dispersion für ca. 2 bis 5 Sekunden gerührt wird.

15 10. Verfahren nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Dispersion mit einer derartigen Geschwindigkeit gerührt wird, daß ein vorbestimmter Durchmesser der SiO_2 -Partikel erzielt wird.

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

25

11. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Dispersion mit 800 - 1800 U/min gerührt wird.
- 5 12. Verfahren nach Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, daß die Dispersion mit 5000 - 20000 U/min gerührt wird.
- 10 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Alkoxysilane Kieselsäureorthoester aliphatischer Alkohole verwendet werden.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß als Ester Methyl-, Ethyl- und/oder Propylester verwendet werden.
- 15 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur säurekatalytischen Hydrolyse verdünnte Säuren und/oder Säuren auf organischer Basis den Alkoxysilanen zugesetzt werden.

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

26

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur säurekatalytischen Hydrolyse Salzsäure, Ameisensäure oder Propionsäure den Alkoxysilanen zugesetzt werden.
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur säurekatalytischen Hydrolyse Mineralsäuren mit einer Konzentration zwischen 0,02 und 1 Mol/Liter zugesetzt werden.
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur säurekatalytischen Hydrolyse Mineralsäuren auf einen Volumenanteil von 15 bis 35 % in der Dispersion zugesetzt werden.
19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur säurekatalytischen Hydrolyse Mineralsäuren auf einen Volumenanteil von 20 bis 28 % in der Dispersion zugesetzt werden.
20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur säurekatalytischen Hydrolyse Monocarbonsäuren als reine

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

27

Säuren zugesetzt werden.

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur säurekatalytischen Hydrolyse Monocarbonsäuren auf einen
5 Volumenanteil von 15 bis 30 % in der Dispersion zugesetzt werden.
22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Säurekonzentration in der Dispersion derart eingestellt
10 wird, daß die erzeugten SiO_2 -Partikel eine vorbestimmte Porenweite aufweisen.
23. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß zur Herstellung von SiO_2 -Partikeln mit einer Porenweite größer ca.
15 30 nm die Säurekonzentration auf größer 0,15 Mol/Liter eingestellt wird.
24. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß zur Herstellung von SiO_2 -Partikeln mit einer Porenweite kleiner ca. 30 nm die Säurekonzentration auf kleiner 0,15 Mol/Liter ein-
20 gestellt wird

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

28

25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Kondensation der Alkoxysilane in Schritt a) bei tiefen
5 Temperaturen durchgeführt wird.
26. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Kondensation der Alkoxysilane in Schritt a) unter Eiskühlung durchgeführt wird.
- 10 27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die wäßrige Dispersion von Alkoxysilanen während Schritt a) zumindest zeitweise mit Ultraschall beschallt wird.
- 15 28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die wäßrige Dispersion von Alkoxysilanen während Schritt a) ca. 5 bis 30 Minuten mit Ultraschall beschallt wird
- 20 29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Herstellung einer Magnetpartikel-Sol-Mischung dem SiO₂-Hydrosol magnetische Partikel in Form von magne-

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

29

tischen Kolloiden, insbesondere Kolloiden magnetischer Nanopartikel, Ferrofluiden, insbesondere Fluiden mit magnetischen Nanopartikeln, und/oder allgemein magnetischen Nanopartikeln zugemischt werden.

- 5
30. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß als magnetische Nanopartikel Magnetit, Übergangsmetalloxide, Ferrite und/oder sonstige nanopartikuläre, Ferro-, Ferri- oder superparamagnetische Verbindungen zugemischt werden.
- 10
31. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß den magnetischen Partikeln Stabilisatoren, Tenside und/oder Emulgatoren zur Bildung einer stabilen wäßrig-kolloidalen Dispersion der magnetischen Partikeln in dem SiO_2 -Hydrosol zugegeben werden.
- 15
32. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als magnetische Partikel Ferrofluide zugegeben werden, die eine homogene Dispersion mit dem SiO_2 -Hydrosol ausbilden,
- 20
33. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

30

che, dadurch gekennzeichnet, daß als magnetische Partikel Ferrofluide, die geladene Tenside, aromatische oder aliphatische Sulfonsäurederivate und/oder aliphatische Carbonsäuren enthalten, zugemischt werden.

5

34. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß magnetische Partikel zugegeben werden, die eine feste und/oder unlösliche Polymerhülle aufweisen.

10

35. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß magnetische Partikel zugegeben werden, die eine Polymerhülle enthaltend oder bestehend aus Polyvinylacetat, Polyvinylalkohol, Dextran, Polyacrolein, Polystyrol, Albumin und/oder Alginat aufweisen.

15

36. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die magnetischen Partikel einen Durchmesser zwischen 0,05 µm und 3 µm aufweisen.

20

37. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die magnetischen Partikel derart zugemischt werden, daß das

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

31

Volumenverhältnis Hydrosol zu magnetischen Partikeln zwischen 2:1 und 4:1 beträgt und/oder der Gewichtsanteil der magnetischen Partikel in der Magnetkolloid-Sol-Mischung zwischen 10 % und 55 % beträgt.

5

38. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Magnetpartikel-Sol-Mischung in einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel für 1 bis 5 Sekunden dispergiert wird.

10

39. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Magnetpartikel-Sol-Mischung in einem mit Wasser nicht-mischbaren und Emulsionen oder Dispersionen bildenden organischen Lösungsmittel dispergiert wird.

15

40. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß dem Lösungsmittel oberflächenaktive Substanzen, Emulgatoren und/oder Tenside zugesetzt werden.

20

41. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß dem Lösungsmittel als oberflächenaktive Substanzen Polyglycerinester,

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

32

Polyäthylenglykol-Castoröl-Derivate, Polyoxy-
äthylen-Sorbitan-Fettsäureester, Alkylphenylpo-
lyäthylenglykol-Derivate, Blockcopolymere aus
Rizinusöl-Derivaten, Propylenoxid-Athylenoxid-
5 Blockcopolymere, modifizierte Polyester, Poly-
äthylenglykol-Ätherderivate, Polyoxypropylen-
Äthylendiamin-Blockcopolymere, Sorbitan-Fett-
säureester, Polyäthylenglykole, Polyoxyäthylen-
Derivate, Polyoxyäthylen-Alkohol-Derivate, Poly-
10 hydroxyfettsäure-Polyäthylenglykol-Blockcopoly-
mere zugesetzt werden.

42. Verfahren nach einem der beiden vorhergehenden
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der An-
teil der oberflächenaktiven Substanzen, Emulga-
15 toren und/oder Tenside in dem organischen Lö-
sungsmittel zwischen 0,1 Volumen-% und 25 Volu-
men-% beträgt.

43. Verfahren nach einem der drei vorhergehenden An-
sprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die ober-
20 flächenaktiven Substanzen, Emulgatoren und/oder
Tenside auf eine Konzentration in der Dispersion
zwischen 0,1 und 15 Volumen-% oder Gewichts-%
zugesetzt werden.

44. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, da-

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

33

5 durch gekennzeichnet, da daß die oberflächenaktiven Substanzen, Emulgatoren und/oder Tenside auf eine Konzentration in der Dispersion zwischen 0,5 und 6 Volumen-% oder Gewichts-% zugesetzt werden.

10 45. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Lösungsmittel derart zugesetzt wird, daß das Volumenverhältnis Lösungsmittel zu Hydrosol zwischen 5:1 und 30:1, vorzugsweise zwischen 8:1 und 30:1 beträgt.

15 46. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Base in Verfahrensschritt d) in einer Konzentration zugegeben wird, so daß die erzeugten SiO₂-Partikel eine vorbestimmte Porenweite aufweisen.

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

34

47. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß zur Herstellung von SiO_2 -Partikeln mit einer Porenweite größer ca. 30 nm die Endkonzentration der zugesetzten Base zwischen 1 und 3 % beträgt.
48. Verfahren nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, daß das zur Herstellung von SiO_2 -Partikeln mit einer Porenweite kleiner ca. 30 nm die Endkonzentration der zugesetzten Base zwischen 6 und 25 % beträgt.
49. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Base Ammoniak zugesetzt wird.
50. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß der Ammoniak in Form einer 1 %igen bis 12 %igen wäßrigen Lösung verwendet wird.
51. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Baseatronlauge (NaOH) verwendet wird.

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

35

52. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Natronlauge in Form einer 0,05 bis 0,1 molaren Lösung verwendet wird.
53. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Volumenverhältnisse der zugesetzten Base und des Hydrosols zwischen 1:2 und 1:4 betragen.
54. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die magnetischen SiO_2 -Partikel, gegebenenfalls mit einem Handmagneten, aus der Dispersion entfernt und gegebenenfalls aufgereinigt werden.
55. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die aus der Dispersion entfernten magnetischen SiO_2 -Partikel ein oder mehrfach mit Alkohol und/oder Wasser gewaschen werden.
56. Verfahren nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die aus der Dispersion entfernten und gegebenenfalls aufgereinigten SiO_2 -Partikel in wäßrigem Medium

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

36

aufbewahrt werden.

57. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die SiO_2 -Partikel mit Alkoxysilanen und/oder substituierten Alkoxysilanen, epoxy-substituierten Alkoxysilan, 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan und/oder 3-Glycidyloxypropylmethyldiäthoxysilan umgesetzt werden und anschließend eine nukleophile Öffnung des Oxiranringes mittels teriärer oder sekundärer Alkylamine durchgeführt wird.
58. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die SiO_2 -Partikel mit Epoxy-substituierten Alkoxysilan, 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan oder 3-Glycidyloxypropylmethyldiäthoxysilan und anschließend mit Carbonsäuren, Sulfiten, Thiosulfaten oder amino-substituierten Carbonsäuren, Nitrilotriessigsäure oder Iminodiessigsäure umgesetzt werden.
59. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die SiO_2 -Partikel mit substituierten Alkylalkoxysilanen der allgemeinen Formel $\text{X}-(\text{CH}_2)_n-\text{Si}-(\text{OR})_3$ umgesetzt werden, wobei X ein Halogen-, Cyano-, NH_2 - oder Mercapto-Rest,

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

37

n = 1 bis 6, vorzugsweise n = 3, und

R ein Alkyl-, Trialkylsilyl-Rest oder H.

- 5 60. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß an die SiO₂-Partikel anschließend Liganden, beispielsweise Peptide, Proteine und/oder Enzyme kovalent gekoppelt werden.
- 10 61. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß dem SiO₂-Hydrosol synthetische, halbsynthetische und/oder natürliche organische Polymere beigemischt werden.
- 15 62. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß als organische Polymere wasserlösliche und/oder mit dem SiO₂-Hydrosol homogene Mischungen ohne Phasentrennung bildende Polymere verwendet werden.
- 20 63. Verfahren nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß organische Polymere mit einer Molmasse zwischen 15000 und 250000 Da beigemischt werden.
64. Verfahren nach einem der drei vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als organi-

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

38

- 5 sche Polymere Polysaccharide, Proteine, Polyvinylalkohol, Dextran, Stärke, Chitosan, Alginate, ficoll, Polyäthylenimin, Agarose, Polyacrylsäure, Polyaminosäuren, Polyvinylpyrrolidon, Hyaluronsäure und/oder Pectinat verwendet werden.
65. Verfahren nach einem Ansprüche 61 bis 64, dadurch gekennzeichnet, daß die organischen Polymere als Lösung beigemischt werden.
- 10 66. Verfahren nach einem der Ansprüche 61 bis 65, dadurch gekennzeichnet, daß die organischen Polymere als 0,5 %ige bis 5 %ige Lösungen beigemischt werden.
- 15 67. Verfahren nach einem der Ansprüche 61 bis 66, dadurch gekennzeichnet, daß die organischen Polymere derart beigemischt werden, daß der Anteil der Polymerlösung in dem Hydrosol zwischen 1 und 30 Volumen-%, vorteilhafterweise zwischen 5 und 25 Volumen-% beträgt.
- 20 68. Magnetische SiO₂-Partikel erhältlich durch ein Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche.
69. Magnetische SiO₂-Partikel, gegebenenfalls nach

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

39

dem vorhergehenden Anspruch, mit einem Partikel-
durchmesser zwischen 0,5 µm und 2000 µm,
dadurch gekennzeichnet,
daß

- 5 in dem SiO₂-Partikel über das gesamte SiO₂-
Partikel magnetische Partikel, beispielsweise
als magnetisches Kolloid oder Ferrofluid, homo-
gen verteilt und eingekapselt sind, wobei der
Anteil der magnetischen Partikel an dem Ge-
10 samtgewicht des SiO₂-Partikels zwischen 10 und
55 % beträgt.
70. Partikel nach einem der beiden vorhergehenden
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie zwi-
schen 2 und 25 Gewichts-% organische Polymere,
15 Polysaccharide und/oder Proteine enthalten.
71. Partikel nach einem der drei vorhergehenden An-
sprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Ober-
fläche der SiO₂-Partikel Gruppen aufweisen, die
mit Oligopeptiden, Oligosacchariden, Oligonu-
20 kleotiden, Polypeptiden, Polynukleotiden, Poly-
sacchariden, Antikörpern, Antikörper-Fragmenten
und/oder Enzymen koppelbar sind.
72. Partikel nach einem der Ansprüche 68 bis 71, da-
durch gekennzeichnet, daß die Oberfläche der

WO 02/09125

PCT/EP01/08392

40

SiO₂-Partikel epoxy-substituiert ist.

73. Partikel nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die epoxy-substituierten SiO₂-Partikel mit sekundären oder tertiären Alkylaminen zu Anionenaustauschern umgesetzt sind.

74. Verwendung magnetischer Partikel nach einem der Ansprüche 68 bis 73 zur Aufreinigung oder Analyse von Nukleinsäuren, Proteinen, Peptiden, Antikörpern oder Antikörperfragmenten oder anderen Biomolekülen bzw. biotinylierter Derivate hiervon, als Ionenaustauscher oder Metalchelat-Träger, als Träger für Biokatalysatoren wie Peptiden, Proteinen und/oder Enzymen, als Biokatalysator in biotechnologischen Fermentationsprozessen, als Protein-Einkapselungsmatrix, als "Stimuli-Response"-Gel, als Adsorber, beispielsweise bei Hämoperfusionen.

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 01/08392

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 H01F1/00 B03C1/01 G01N33/543 C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 H01F B03C G01N C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 41811 A (LESNIAK CHRISTOPH ;KLEIBER JOERG (DE); MENNIG MARTIN (DE); WALTER) 27 December 1996 (1996-12-27) page 3, paragraph 3 page 4, paragraph 2 -page 6, paragraph 1 page 9, paragraph 1; claims 1-3,6,7,11 ---	1,24,29, 30,60, 68,71,74
A	WO 00 32762 A (MENNIG MARTIN ;HARTTIG HERBERT (DE); SCHMIDT HELMUT (DE); RIEDLING) 8 June 2000 (2000-06-08) page 8, paragraph 4; claims 1,2,5,11 --- -/-	1,13,27, 54,60, 68,71,74

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 November 2001

Date of mailing of the international search report

08/11/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Decanniere, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent No.

PCT/EP 01/08392

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ZHANG L ET AL: "SIZE QUANTIZATION AND INTERFACIAL EFFECTS ON A NOVEL GAMMA-FE₂O₃/SiO₂ MAGNETIC NANOCOMPOSITE VIA SOL-GEL MATRIX-MEDIATED SYNTHESIS" JOURNAL OF APPLIED PHYSICS, AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS, NEW YORK, US, vol. 81, no. 10, 15 May 1997 (1997-05-15), pages 6892-6900, XP000658306 ISSN: 0021-8979 page 6893, column 2, paragraph 1 -page 6894, column 2</p> <p>-----</p>	<p>1,13,14, 29,30, 32,36, 68,69</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent Application No

PCT/EP 01/08392

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9641811	A	27-12-1996	DE 19520398 A1	12-12-1996
			DE 19537985 A1	17-04-1997
			AU 707115 B2	01-07-1999
			AU 6300796 A	09-01-1997
			CA 2223821 A1	27-12-1996
			CN 1192217 A	02-09-1998
			WO 9641811 A1	27-12-1996
			EP 0837871 A1	29-04-1998
			JP 11509364 T	17-08-1999
			NO 975772 A	06-02-1998
			NZ 311648 A	30-08-1999
			US 6255477 B1	03-07-2001
WO 0032762	A	08-06-2000	DE 19855259 A1	31-05-2000
			DE 19854973 A1	31-05-2000
			AU 1652800 A	19-06-2000
			WO 0032762 A1	08-06-2000
			EP 1144620 A1	17-10-2001
			NO 20012620 A	27-07-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Zeichen
PCT/EP 01/08392A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 H01F1/00 B03C1/01 G01N33/543 C12N15/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 H01F B03C G01N C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, INSPEC, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 96 41811 A (LESNIAK CHRISTOPH ;KLEIBER JOERG (DE); MENNIG MARTIN (DE); WALTER) 27. Dezember 1996 (1996-12-27) Seite 3, Absatz 3 Seite 4, Absatz 2 -Seite 6, Absatz 1 Seite 9, Absatz 1; Ansprüche 1-3,6,7,11	1,24,29, 30,60, 68,71,74
A	WO 00 32762 A (MENNIG MARTIN ;HARTTIG HERBERT (DE); SCHMIDT HELMUT (DE); RIEDLING) 8. Juni 2000 (2000-06-08) Seite 8, Absatz 4; Ansprüche 1,2,5,11 --- -/--	1,13,27, 54,60, 68,71,74

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. November 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

08/11/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Decanniere, L

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/08392

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	<p>ZHANG L ET AL: "SIZE QUANTIZATION AND INTERFACIAL EFFECTS ON A NOVEL GAMMA-FE₂O₃/SiO₂ MAGNETIC NANOCOMPOSITE VIA SOL-GEL MATRIX-MEDIATEDSYNTHESIS" JOURNAL OF APPLIED PHYSICS, AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS, NEW YORK, US, Bd. 81, Nr. 10, 15. Mai 1997 (1997-05-15), Seiten 6892-6900, XP000658306 ISSN: 0021-8979 Seite 6893, Spalte 2, Absatz 1 -Seite 6894, Spalte 2</p> <p>-----</p>	<p>1,13,14, 29,30, 32,36, 68,69</p>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ales A... chen

PCT/EP 01/08392

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9641811 A	27-12-1996	DE 19520398 A1	12-12-1996
		DE 19537985 A1	17-04-1997
		AU 707115 B2	01-07-1999
		AU 6300796 A	09-01-1997
		CA 2223821 A1	27-12-1996
		CN 1192217 A	02-09-1998
		WO 9641811 A1	27-12-1996
		EP 0837871 A1	29-04-1998
		JP 11509364 T	17-08-1999
		NO 975772 A	06-02-1998
		NZ 311648 A	30-08-1999
		US 6255477 B1	03-07-2001
WO 0032762 A	08-06-2000	DE 19855259 A1	31-05-2000
		DE 19854973 A1	31-05-2000
		AU 1652800 A	19-06-2000
		WO 0032762 A1	08-06-2000
		EP 1144620 A1	17-10-2001
		NO 20012620 A	27-07-2001

THIS PAGE BLANK (JSPTO)